

## Résumé

La Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO ; EC 4.1.1.39) a été étudiée dans les feuilles de vitroplants et d'individus adultes chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) et le cocotier (*Cocos nucifera* L.). Les tests de double immunodiffusion d'Ouchterlony ont permis de tester les extraits enzymatiques des 2 espèces, à l'aide d'antisera de lapin dirigés contre la RubisCO d'épinard, de tabac et de maïs. Afin de quantifier la RubisCO dans le matériel végétal prélevé sur plants adultes et sur vitroplants, nous avons mis au point une méthode d'estimation via la technique d'immunoélectrophorèse de Laurell. Les teneurs en RubisCO mesurées représentent, pour le vitroplant de palmier à huile, environ 25 % des protéines solubles totales de la feuille, et 35 % chez le plant adulte. Chez le cocotier, ces valeurs sont de l'ordre de 25 % pour les 2 types de matériel analysés. L'intérêt de cette approche biochimique, pour l'étude de la photosynthèse in vitro chez le cocotier, est discuté.

## Abstract

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO; EC 4.1.1.39) was studied in the leaves of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and coconut (*Cocos nucifera* L.) in vitro plantlets and adults. The Ouchterlony double immunodiffusion test was applied to the enzyme extracts of both species, using rabbit antisera raised against RubisCO from spinach, tobacco and maize. To quantify RubisCO in the material sampled from adult palms and in vitro plantlets, we developed an estimation method based on the Laurell immunoelectrophoresis test. The RubisCO contents measured represented around 25% of total soluble proteins in the leaves of oil palm ramets and 35% in those of adult palms. For coconut, the figure was around 25% for both types of material. The merits of this biochemical approach for studying in vitro photosynthesis in coconut are discussed.

## Resumen

Se estudiaron la Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxygenase (RubisCO ; EC 4.1.1.39) en las hojas de vitroplanta y de individuos adultos en palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) y cocotero (*Cocos nucifera* L.). Las pruebas de doble inmunodifusión de Ouchterlony permitieron someter a prueba los extractos enzimáticos de las 2 especies, mediante antisuero de conejo dirigidos contra la RubisCO de espinaca, de tabaco y de maíz. Para cuantificar la RubisCO en el material vegetal tomado en plantas adultas y en vitroplantas, hemos puesto al punto un método de estimación vía la técnica de inmunoélectroforesis de Laurell. Los contenidos de RubisCO medidos representan, para la vitroplanta de palma aceitera, unas 25% de las proteínas solubles totales de la hoja, y el 35% en la planta adulta. En el cocotero, estos valores son del orden del 25% para los 2 tipos de material analizados. Se discute el interés de este enfoque bioquímico para el estudio de la fotosíntesis in vitro en el cocotero.

# Etude immunologique de la RubisCO chez le palmier à huile et le cocotier

Rival A.<sup>1</sup>, Beulé T.<sup>1</sup>, Nato A.<sup>2</sup>, Laverge D.<sup>2</sup>

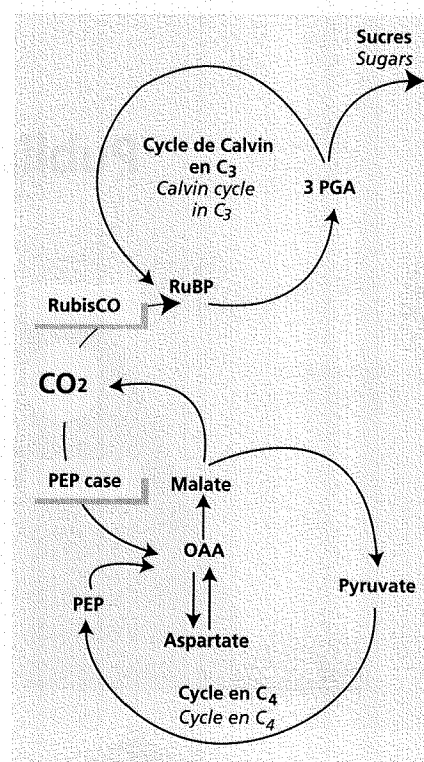
<sup>1</sup> CIRAD-CP/ORSTOM, LRGAPT, BP 5045, 911 avenue Agropolis, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> Université de PARIS XI, Centre d'Orsay, LMVE, bat. 430, 91405 Orsay, France

La Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO ; EC 4.1.1.39) intervient lors de la première étape du cycle des pentoses phosphates (cycle de Calvin) : la fixation du gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) sur une molécule de Ribulose diphosphate (figure 1). Cette enzyme joue, par conséquent, un rôle primordial dans la régulation de l'activité photosynthétique. Très abondante, la RubisCO représente 25 % environ des protéines solubles totales de la feuille chez les plantes à photosynthèse C<sub>4</sub> et jusqu'à 50 % de ces protéines chez les plantes en C<sub>3</sub> (encadré 1). On attribue aux 40 millions de tonnes de RubisCO, estimées à la surface du globe, la fixation annuelle de quelques 10<sup>11</sup> tonnes de CO<sub>2</sub> ! (Miziorko et Lorimer, 1983). Le rôle clef de la RubisCO dans le processus général de la photosynthèse a suscité de nombreuses études fondamentales, sur un grand nombre d'espèces (Miziorko et Lorimer, 1983 ; Suzuki, 1987).

Chez les plantes supérieures, la RubisCO a été localisée dans le stroma des chloroplastes des cellules chlorenchymateuses des plantes en C<sub>3</sub> et des plantes CAM (*Crassulacean acid metabolism*), et dans les chloroplastes des cellules de la gaine de la structure en couronne (Kranz) chez les plantes en C<sub>4</sub>.

La RubisCO, chez les végétaux supérieurs comme chez les algues, les cyanobactéries et les bactéries photosynthétiques, est un complexe oligomérique composé de 8 grandes (LSU : 50-55 kilo Dalton (kDa) et 8 petites (SSU : 12-18 kDa) sous-unités, suivant un schéma d'organisation symétrique (figure 2).



**Figure 1.** Schéma simplifié de la photosynthèse chez les plantes en C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>. / Simplified diagram of photosynthesis in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant.



### ■ Plantes en $C_3$ , plantes en $C_4$

Chez les plantes en  $C_3$  (tabac, épinard, palmier, cocotier), le  $CO_2$  atmosphérique est incorporé dans le cycle de Calvin. La première étape de la photosynthèse est la fixation, catalysée par la RubisCO, du  $CO_2$  sur une molécule de RuBP.

Chez les plantes en  $C_4$  (maïs, canne à sucre), la fixation primitive du  $CO_2$  a lieu dans les cellules de la gaine périvasculaire (cellules de Kranz) en suivant le cycle de Hatch et Slack. Le  $CO_2$  est fixé sur le PEP via la PEPC pour donner une molécule d'oxaloacétate (instable).

Lorsque des cellules ou des organes de plantes de type  $C_3$  sont cultivés *in vitro* sur un milieu riche en hydrates de carbone, le métabolisme s'oriente vers une fixation préférentielle du  $CO_2$  de type  $C_4$  par la voie PEPC. Le PEP est alors apporté par la glycolyse, et la fixation du  $CO_2$  est non-photosynthétique (anaplérotique).

Lorsque les plantes en  $C_3$  sont cultivées *in vitro* sur un milieu riche en hydrates de carbone (glucose ou saccharose le plus souvent), le carbone inorganique ( $CO_2$ ) est assimilé suivant 2 voies de carboxylation. L'une a lieu dans le chloroplaste sous le contrôle de la RubisCO, c'est la voie classique, telle qu'elle opère dans la feuille *in planta* ; une deuxième voie d'incorporation du  $CO_2$  est activée dans le cytosol, via la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) (Nato *et al.*, 1981 ; Kumar *et al.*, 1988 ; Hdider et Desjardin, 1994).

Le rapport des 2 activités PEPC/RubisCO est un indicateur précis de l'importance relative de la fixation non photosynthétique (hétérotrophique) et photosynthétique (autotrophique) du  $CO_2$  dans le matériel végétal (Kumar *et al.*, 1988). Chez les végétaux en  $C_3$ , comme le palmier à huile et le cocotier, le rapport PEPC/RubisCO est de l'ordre de 0,1 dans la feuille adulte en conditions naturelles (Williams et Kennedy, 1978).

### ■ Abréviations

DTT, dithiothreitol ; EDTA, Ethylene diamino tetraacetic acid ; ELISA, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ; OAA, acide oxaloacétique ; 3PGA, acide 3-phosphoglycérique ; PMSF, phenyl-methyl sulfonyl fluoride ; PST, protéines solubles totales ; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31) ; PVP, polyvinyl pyrrolidone ; RIA, Radio Immuno Assay ; RubP, Ribulose-1,5 diphosphate ; RubisCO, Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39).

Chez le palmier à huile, l'évolution du rapport des activités PEPC/RubisCO a été étudié lors des divers stades de la micropropagation *in vitro* par embryogenèse somatique, puis lors de l'acclimatation des vitroplants aux conditions naturelles (de Touchet *et al.*, 1993 ; Rival *et al.*, 1994a, 1994b, 1996). Chez le cocotier, plante pour laquelle les problèmes d'acclimatation en sortie de tubes s'avèrent plus aigus, l'évolution *in vitro* du rapport PEPC/RubisCO fait actuellement l'objet d'un programme de recherche dans notre groupe (Triques et Rival, comm. pers.). L'étude de la RubisCO revêt un intérêt tout particulier dans le matériel végétal cultivé *in vitro*, car le niveau d'activité de cette enzyme renseigne également sur l'intégrité de l'appareil chloroplastique.

La mesure des activités carboxylasiques et la quantification des carboxylases, corrélées à d'autres paramètres photosynthétiques *in planta*, comme la mesure des échanges gazeux ou l'activité photochimique (estimée via la fluorescence *in situ* des chlorophylles), permet de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'accession à l'autotrophie dans le matériel cultivé *in vitro* et lors de l'acclimatation aux conditions naturelles.

Le but du présent article est de proposer une méthode immunoenzymologique simple et fiable de quantification de l'enzyme RubisCO chez le palmier à huile et le cocotier.

Dans un premier temps, des antisera anti-RubisCO d'origines diverses ont été testés contre des extraits enzymatiques bruts de feuilles de palmier et de cocotier, par des tests de double immunodiffusion d'Ouchterlony (1958).

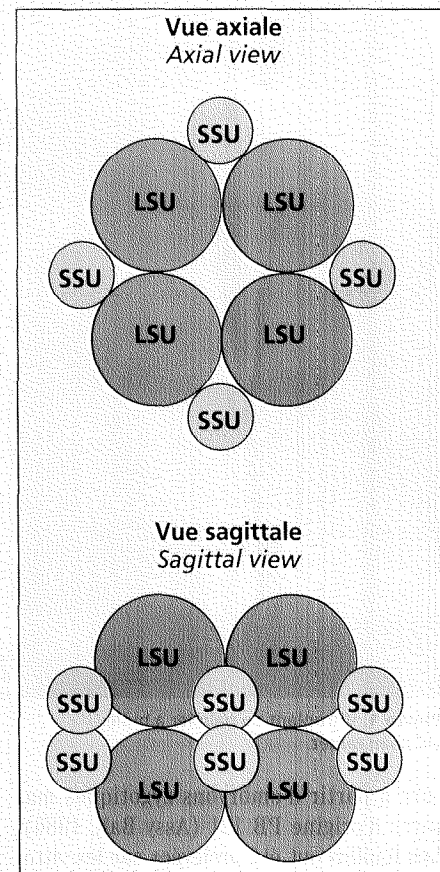
L'estimation des teneurs en RubisCO par technique d'immunoélectrophorèse de Laurell (1966) a été ensuite possible grâce aux réactions sérologiques positives obtenues avec les antisera testés.

## Matériel et Méthodes

### Matériel végétal

#### Palmier à huile

Les feuilles utilisées pour la présente étude ont été prélevées dans la flèche d'un palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) adulte de 2 ans, issu de semis et cultivé en serre tropicale. Les graines germées sélectionnées d'origine hybride *dura* x *pisifera* (D1439) nous ont été aimablement fournies par le Dr N. Djegui, directeur de l'INRAB-SRPH<sup>1</sup> à Pobé au Bénin.



**Figure 2.** Structure quaternaire de la molécule de RubisCO (schéma d'après Miziorko et Lorimer 1983). / Quaternary structure of a RubisCO molecule (according to Miziorko and Lorimer, 1983).

Les vitroplants clonaux (clone TRL 80, origine *dura* x *pisifera*) ont été obtenus via micropropagation *in vitro* par embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires (Pannetier *et al.*, 1981). Les feuilles ont été prélevées à la fin de l'étape d'enracinement *in vitro* (photo 1).

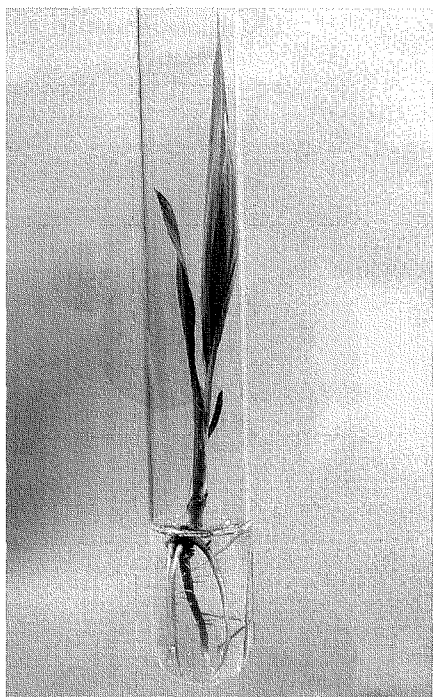
#### Cocotier

Les feuilles ont été prélevées dans la flèche d'un cocotier (*Cocos nucifera* L.) adulte d'origine hybride PB 121 (Nain Jaune Malais x Grand Ouest Africain) cultivé en serre tropicale, issu de culture d'embryons *in vitro*. Les embryons zygotiques isolés à l'origine de cet individu ont été prélevés et cultivés *in vitro* par le Dr B. Assy Bah, station de recherche IDEFOR/DPO<sup>(2)</sup> Marc Delorme, Côte d'Ivoire. Les vitroplants utilisés lors de l'étape d'immunoquantification de la RubisCO ont été obtenus par embryocul-

(1) Institut national de la recherche agronomique du Bénin. Station de recherches sur le palmier à huile.

(2) Institut des forêts. Département des plantes oléagineuses.





**Photo 1.** Vitroplant de palmier à huile.  
Oil palm ramet.

A. Rival

ture à partir d'embryons zygotiques matures d'origine PB 121 (Assy Bah, 1986). Les feuilles ont été prélevées sur les vitroplants à l'issue de la phase de rhizogenèse *in vitro* (photo 2).

### Extraction des protéines solubles et de l'enzyme RubisCO

Les feuilles fraîches (env. 1 g MF<sup>(3)</sup>) sont broyées au mortier dans 10 ml de tampon d'extraction composé de : Tris (100 mM), pH 7,6, 2,5 mM EDTA, 5 mM DTT, PVP insoluble 33 % (gg<sup>1</sup><sub>MF</sub> de feuilles), 10 mM β-mercaptoéthanol et 250 μM PMSF. L'homogénat est centrifugé (40 000 g, 30 min). Les protéines solubles du surnageant sont conservées et constituent l'extrait enzymatique brut (EEB). L'ensemble de l'extraction est réalisé à 0-4 °C. Les extraits enzymatiques sont utilisés extemporanément pour les tests immunoenzymologiques.

### Dosage des protéines

Les protéines de l'extrait ont été estimées par dosage colorimétrique suivant la méthode de Bradford (1976) en utilisant la *Serum Albumine Bovine* (Sigma P-0914) comme standard.

### Mesure de l'activité enzymatique

L'activité RubisCO est mesurée *in vitro* sur les extraits enzymatiques bruts en suivant l'incorporation, RubP-dépendante, de

bicarbonate de sodium marqué au <sup>14</sup>C, suivant la méthode décrite par Nato *et al.* (1985). Les extraits bruts sont incubés à 30°C durant 30 minutes. L'activité RubisCO spécifique est exprimée en μmol CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protéines.

### Tests immunologiques

Les tests de double immunodiffusion sont réalisés en suivant la méthode d'Ouchterlony (1958). Les gels d'agarose sont préparés dans un tampon Borate/NaOH 166 mM, pH 8,0, NaCl 1,3 M, glycérol (5 % v/v). Un sérum pré-immun sert de témoin. Dix μl de la solution d'antisérum ou de protéines sont déposés dans des puits équidistants réalisés à l'emporte-pièce. Nous avons testé dans cette étude 3 antisera de lapin dirigés contre la RubisCO extraite de feuilles de tabac (Nato *et al.*, 1985), d'épinard (gracieusement fourni par le Dr Piquemal, CNRS Toulouse, France) et de maïs (Laverge *et al.*, 1992). Ces antisera ont été appelés respectivement RT, RS, et RM pour la suite de l'étude. Les bandes d'immunoprécipitation sont développées durant 24 h à 4°C en chambre humide. Les gels sont ensuite

rincés avec une solution de NaCl 0,9 % afin d'éliminer les protéines en excès, puis ils sont séchés dans une étuve à 40°C. Les bandes de précipitine sont colorées par une solution de bleu de Coomassie R250 dans un mélange acide acétique/méthanol/eau (1,5 : 45 : 53,5), puis l'excès de colorant est éliminé par trempage dans une solution d'acide acétique/méthanol/eau (10 : 45 : 45).

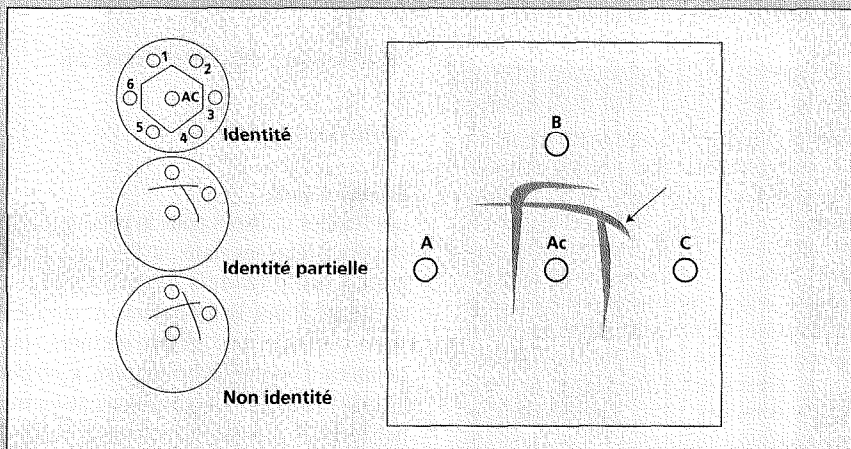
### Immunoélectrophorèse

Les teneurs en RubisCO dans les extraits enzymatiques bruts ont été estimées par immunoélectrophorèse suivant la méthode de Laurell (1966), avec un système de tampon gel/cuve Tris-Glycine 50 mM (pH 8,3). Les gels sont préparés à 1,5 % avec de l'agarose à bas point de fusion (Sigma A6013). Un volume de solution d'agarose de 36 ml est nécessaire pour la préparation d'un gel de 170 mm x 80 mm, contenant 60 μl d'antisérum RS. On utilise comme standard de calibration une RubisCO purifiée d'épinard disponible commercialement (Sigma R-8000). L'électrophorèse horizontale s'effectue à 80 V (15 mA) durant 12 h à 4°C. Après la migration électrophorétique, les gels sont rin-

#### ■ Le test de double immunodiffusion d'Ouchterlony

**Principe :** antigènes (extraits enzymatiques végétaux) et anticorps (antisérums de lapin) sont mis à diffuser librement à partir de puits creusés dans un gel d'agarose faiblement concentré, coulé sur une plaque de verre. Ils donnent lieu, à l'équivalence, à la formation d'un arc d'immunoprécipitation. Si la concentration en anticorps est en excès relatif par rapport à celle en antigènes, les arcs se forment plus près du puits contenant l'antigène ; l'inverse est observé en cas d'excès d'antigènes.

**Analyse des réactions croisées :** l'antisérum Ac placé dans le puits central a été préparé contre l'antigène B qui le précipite en donnant 2 lignes de précipités. Il est aussi précipité par les 2 antigènes A et C. L'antigène A possède un déterminant identique à l'antigène B et le précipité donné par A est dans la prolongation directe d'un des 2 précipités donnés par B. C'est une réaction d'homologie totale. L'antigène B pourrait être contaminé par A, ce qui expliquerait que A ne possède qu'un des 2 déterminants présentés par B. Par ailleurs, l'antisérum pourrait ne pas être monospécifique et reconnaître les 2 antigènes. L'antigène C possède un déterminant voisin de B (réaction d'identité partielle). La projection indiquée par la flèche est située du côté opposé au puits contenant l'antigène B contre lequel l'antisérum a été produit.



(3) MF : matières fraîches.



cés dans une solution de NaCl 0,9 %, puis séchés et colorés comme précédemment décrit pour les tests d'Ouchterlony.

La surface des halos d'immunoprécipitation (*immunorockets*) est calculée après digitalisation des gels grâce à un système de traitement d'image (Leica Quantimet 500). Les teneurs relatives en RubisCO, dans les extraits bruts, sont estimées après réalisation d'une droite de calibration à l'aide de RubisCO d'épinard purifiée.

## Résultats et discussion

### Identité immunologique des RubisCO extraites de palmier et de cocotier

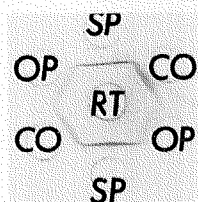
La figure 3 montre les résultats des tests de double immunodiffusion réalisés avec l'antisérum RT (tabac). On note une homologie sérologique totale entre la RubisCO extraite de palmier à huile (OP), d'épinard (SP) et de cocotier (CO). Lorsque le test est effectué avec l'antisérum anti-RubisCO de maïs RM (figure 4), on observe également une homologie complète entre les extraits de palmier à huile, de cocotier et d'épinard, comme le montrent les bandes d'immunoprécipitation jointives.

L'antisérum anti-RubisCO d'épinard (RS) révèle (figure 5) encore une homologie complète entre RubisCO extraite de palmier et de cocotier, alors que l'homologie est seulement partielle entre palmier et épinard d'une part, et cocotier et épinard d'autre part.

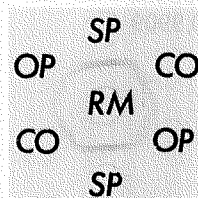
Par ailleurs, des tests de double immunodiffusion ont été réalisés afin de comparer l'immunoréactivité des 3 antiséras vis-à-vis du même extrait enzymatique. Les figures 6 et 7 confirment qu'une réaction positive croisée est obtenue avec les extraits des 2 palmacées contre l'ensemble des antiséras testés. L'absence de bande d'immunoprécipitation avec un sérum pré-immun est vérifiée. La spécificité des 3 antiséras (RT, RS et RM) a été testée en utilisant une RubisCO d'épinard purifiée (figure 8). La présence d'une bande de précipité unique reflète alors la monospécificité pour la RubisCO des antiséras utilisés.

L'homologie sérologique complète entre la RubisCO extraite de palmier à huile et de cocotier, 2 espèces de palmiers de la famille des *Arecaceae*, confirme les résultats exposés par Suzuki (1987). En effet, cet auteur rappelle que, en ce qui concerne la structure primaire (séquence des acides aminés), le degré d'homologie est de 95 % pour la grande sous-unité (LSU) et de 70 % pour la petite sous-unité (SSU) chez les plantes supérieures. On comprend alors les réactions d'identité partielle obtenues en réalisant des tests de double immunodiffusion portant sur tabac/épinard, épinard/maïs, mais aussi épinard/*Chlorella* et épinard/*Clostridium*, en utilisant un antisérum dirigé contre l'holoenzyme extraite de la première espèce du couple testé (Suzuki, 1987).

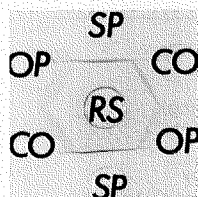
De même, Afif *et al.* (1993) ont mis en évidence une excellente conservation des caractéristiques de la LSU entre 2 espèces de conifères.



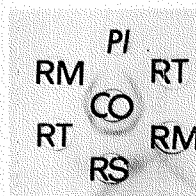
**Figure 3.** Test de double immunodiffusion entre la RubisCO extraite de cocotier (CO), de palmier à huile (OP) ou d'épinard (SP) et l'immunosérum dirigé contre la RubisCO de tabac (RT). / Double immunodiffusion test on the RubisCO extracted from coconut (CO), oil palm (OP), spinach (SP) and the immunoserum raised against tobacco RubisCO (RT).



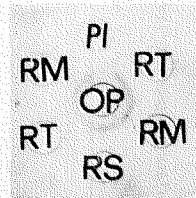
**Figure 4.** Test de double immunodiffusion entre la RubisCO extraite de cocotier (CO), de palmier à huile (OP) ou d'épinard (SP) et l'immunosérum dirigé contre la RubisCO de maïs (RM). / Double immunodiffusion test on the RubisCO extracted from coconut (CO), oil palm (OP), spinach (SP) and the immunoserum raised against maize RubisCO (RM).



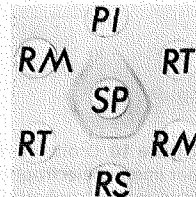
**Figure 5.** Test de double immunodiffusion entre la RubisCO extraite de cocotier (CO), de palmier à huile (OP) ou d'épinard (SP) et l'immunosérum dirigé contre la RubisCO d'épinard (RS). / Double immunodiffusion test on the RubisCO extracted from coconut (CO), oil palm (OP), spinach (SP) and the immunoserum raised against spinach RubisCO (RS).



**Figure 6.** Test de double immunodiffusion entre la RubisCO extraite de cocotier (CO) et le sérum pré-immun (PI) ou l'immunosérum dirigé contre la RubisCO de tabac (RT), de maïs (RM) ou d'épinard (RS). / Double immunodiffusion test on the RubisCO extracted from coconut (CO) and pre-immune serum (PI) or the immunoserum raised against tobacco (RT), maize (RM) or spinach (RS) RubisCO.



**Figure 7.** Test de double immunodiffusion entre la RubisCO extraite de palmier (OP) et le sérum pré-immun (PI) ou l'immunosérum dirigé contre la RubisCO de tabac (RT), de maïs (RM) ou d'épinard (RS). / Double immunodiffusion test on the RubisCO extracted from oil palm (OP) and pre-immune serum (PI) or the immunoserum raised against tobacco (RT), maize (RM) or spinach (RS) RubisCO.



**Figure 8.** Test de double immunodiffusion entre la RubisCO extraite d'épinard (SP) et le sérum pré-immun (PI) ou l'immunosérum dirigé contre la RubisCO de tabac (RT), de maïs (RM) ou d'épinard (RS). / Double immunodiffusion test on the RubisCO extracted from spinach (RS) and pre-immune serum (PI) or the immunoserum raised against tobacco (RT), maize (RM) or spinach (RS) RubisCO.

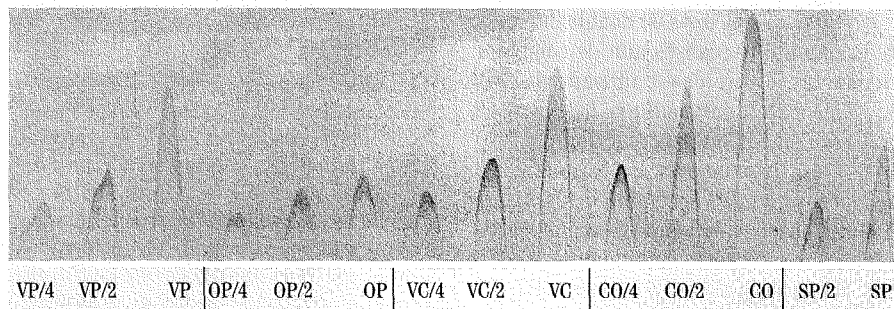
### ■ L'immunoélectrophorèse de Laurell

Un antisérum monospécifique est incorporé dans une plaque de gel d'agarose. Différentes concentrations de la préparation antigénique à doser sont réparties dans des puits alignés. Un champ électrique est alors appliqué perpendiculairement à la ligne des puits. Un halo d'immunoprécipitation en forme de fusée (*immunorocket*) se forme et progresse tant que l'antigène est en excès. L'existence d'une relation linéaire entre la concentration en antigène dans le puits et la surface de l'immunoprécipité permet d'employer cette méthode pour un dosage précis et sensible des antigènes. Une série de tests préliminaires est indispensable pour fixer la concentration optimale en anticorps dans le gel. Si cette teneur est trop faible, on obtient des pics très hauts, sans relation de linéarité avec la quantité d'antigène déposée.

Les résultats obtenus sur le palmier à huile et le cocotier, à l'aide de 3 antiséras différents dirigés contre l'holoenzyme, suggèrent donc une homologie sérologique complète portant probablement sur les 2 sous-unités. Il est probable que les RubisCO de palmier et cocotier d'une part et d'épinard d'autre part n'aient en commun que la grande sous-unité. Une étude par immunoeempreintes (*western blot*), mettant en jeu les 3 antiséras testés, permettra de préciser ce point.

Nous avons précédemment mis en évidence l'existence de réactions sérologiques croisées entre un antisérum anti-RubisCO





**Figure 9.** Quantification de la RubisCO dans les extraits protéiques par immunoélectrophorèse. VP : vitroplant de palmier à huile, OP : palmier à huile adulte, VC : vitroplant de cocotier, CO : cocotier adulte, SP : étalon RubisCO d'épinard. / *RubisCO quantification in protein extracts by immunoelectrophoresis. VP: oil palm ramet, OP: adult oil palm, VC: coconut in vitro plantlet, CO: adult coconut palm, SP: spinach RubisCO standard.*

Les extraits ont été distribués sur le gel comme suit : / *the extracts were distributed on the gel as follows:*

VP/4 à VP/1 : vitroplant de palmier à huile : 0,46 ; 0,92 ; 1,85  $\mu\text{g}$  protéines. / *VP/4 to VP/1: oil palm ramet: 0.46; 0.92; 1.85  $\mu\text{g}$  proteins.*

OP/4 à OP/1 : palmier à huile adulte : 0,53 ; 1,07 ; 2,13  $\mu\text{g}$  protéines. / *OP/4 to OP/1: adult oil palm: 0.53; 1.07; 2.13  $\mu\text{g}$  proteins.*

VC/4 à VC/1 : vitroplant de cocotier : 0,47 ; 0,95 ; 1,90  $\mu\text{g}$  protéines. / *VC/4 to VC/1: coconut in vitro plantlet: 0.47; 0.95; 1.90  $\mu\text{g}$  proteins.*

CO/4 à CO/1 : cocotier adulte : 0,47 ; 0,95 ; 1,90  $\mu\text{g}$  protéines. / *CO/4 to CO/1: adult coconut palm: 0.47; 0.95; 1.90  $\mu\text{g}$  proteins.*

SP/2 à SP/1 : RubisCO épinard standard : 0,16 ; 0,32  $\mu\text{g}$  protéines. / *SP/2 to SP/1: standard spinach RubisCO: 0.16; 0.32  $\mu\text{g}$  proteins.*

de tabac et des extraits foliaires de palmier à huile (de Touchet *et al.*, 1993). Aujourd'hui, la mise en évidence d'une homologe sérologique complète entre RubisCO extraites de palmier à huile et de cocotier ouvre la voie à l'immunoquantification de cette enzyme chez le cocotier et à son application à la caractérisation du matériel végétal issu de culture *in vitro*.

### Immunoquantification de la RubisCO

#### Calibration

La droite de référence a été réalisée en utilisant une RubisCO purifiée d'épinard disponible commercialement (Sigma R-8000), dans une gamme de 30 à 550 ng (figure 10). La quantité de RubisCO est donc significativement corrélée ( $r = 0,998$ ) à la surface des halos d'immunoprécipitation. La sensibilité de la méthode est donc très satisfaisante, puisqu'elle permet de détecter et d'estimer correctement des quantités de RubisCO inférieures à 50 ng (nanogramme) dans 3 à 10  $\mu\text{l}$  d'extrait enzymatique (soit environ 10 mg de matière fraîche). En outre, il est important de noter que la quantification de la RubisCO peut s'effectuer sur des extraits enzymatiques bruts, sans étape de purification préalable.

#### Estimation comparée des activités et des teneurs en RubisCO

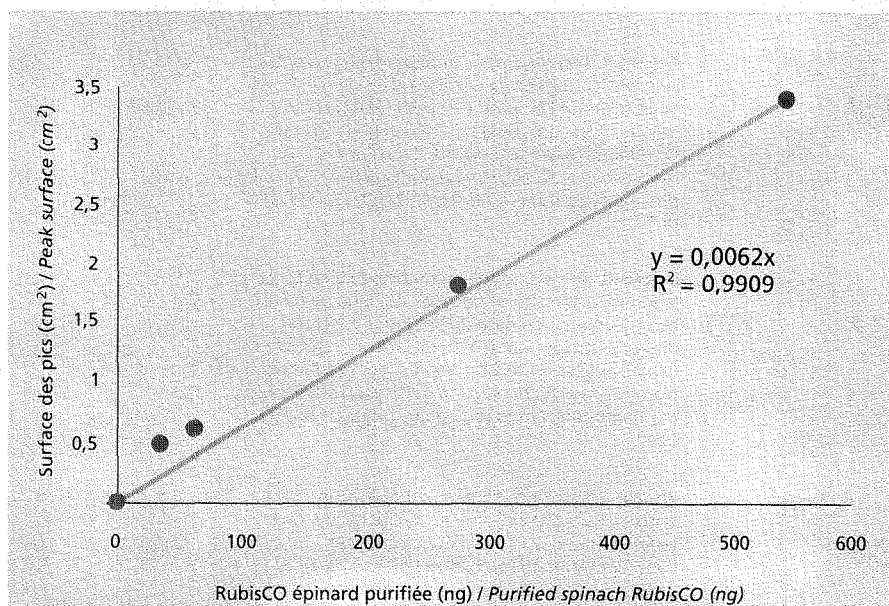
Nous avons comparé des arbres adultes et des vitroplants prélevés juste avant le se-

vrage *ex vitro* pour les 2 espèces, en termes de teneur en RubisCO foliaire. La figure 9 montre le résultat de l'immunoélectrophorèse réalisée sur des extraits bruts. Les immunoélectrophorèses ont été réalisées à teneur en protéines constante (environ 2  $\mu\text{g}$  par extrait). Les résultats concernant les teneurs en RubisCO (en  $\text{mg g}^{-1}$  protéines) et les mesures d'activité RubisCO totale et spécifique (exprimées par rapport au poids de MF ou à la quantité de protéines solubles) sont exposés dans le tableau.

L'immunoélectrophorèse a permis d'estimer la teneur en RubisCO, dans le vitroplant et dans l'individu adulte du palmier à huile à respectivement  $25 \pm 2\%$  et  $35 \pm 10\%$  des protéines solubles. Chez le cocotier, les teneurs estimées sont de  $25 \pm 8\%$  dans le vitroplant et de  $21 \pm 5\%$  dans l'arbre adulte.

Les niveaux de RubisCO sont du même ordre chez les 2 espèces, mais il est intéressant de noter que, pour le palmier à huile seulement, le niveau d'activité et la teneur en RubisCO sont plus élevés chez le plant adulte. L'occurrence de teneurs en RubisCO comparables entre plant adulte et vitroplant chez le cocotier confirme l'efficacité du protocole amélioré d'embryoculture mis au point dans notre équipe. Au cours de ce protocole, les vitroplants sont cultivés en conteneurs de grande capacité (1 l) sur 200 ml de milieu liquide durant 2 mois supplémentaires par rapport au procédé précédemment décrit (Assy Bah, 1986). On obtient ainsi des vitroplants de 15 à 20 cm, présentant un système racinaire bien développé et 4 à 5 feuilles ouvertes (photo 2). Les vitroplants ainsi cultivés présentent un taux de RubisCO comparable à celui de plants adultes cultivés en serres, ce qui constitue un indicateur favorable pour une bonne reprise de croissance en autotrophie lors du sevrage. De fait, les taux de succès à l'acclimatation *ex vitro* sur ce matériel sont supérieurs à 90 % (photo 3).

Le saccharose, utilisé comme source de carbone dans les milieux de culture, est généralement décrit comme responsable d'une inhibition de la RubisCO (Grout et



**Figure 10.** Droite de régression permettant la quantification de la RubisCO par immunoélectrophorèse. / *Regression curve enabling RubisCO quantification by immunoelectrophoresis.*



Comparaison des activités spécifiques (mesurées par incorporation de  $^{14}\text{CO}_2$ ) et des teneurs en RubisCO (par immunoélectrophorèse) dans des vitroplants et des arbres adultes de palmier à huile et de cocotier cultivés en serres. / *Comparison of RubisCO specific activity (measured by incorporating  $^{14}\text{CO}_2$ ) and contents (by immunoelectrophoresis) in oil palm and coconut in vitro plantlets and adult palms grown in greenhouses.*

Matériel végétal Plant material	Protéines solubles totales Total soluble proteins <sup>1</sup>	Activité RubisCO totale Total RubisCO activity <sup>2</sup>	Activité RubisCO spécifique Specific RubisCO activity <sup>3</sup>	Teneur relative en RubisCO Relative RubisCO content <sup>4</sup>
Vitroplant (palmier) Oil palm ramet	1,48	7,21	4,89	252,3
D1439 adulte (palmier) Adult oil palm	2,69	16,76	6,22	353,6
Vitroplant (cocotier) Coconut in vitro plantlet	8,78	75,90	8,65	246,1
PB121 adulte (cocotier) Adult coconut palm	12,22	86,96	7,12	217,8

<sup>1</sup>:  $\text{mg g}^{-1}\text{MF}$ ; <sup>2</sup>:  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{MF}$ ; <sup>3</sup>:  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{PST}$ ; <sup>4</sup>:  $\text{mg g}^{-1}\text{PST} / 1$ ;  $\text{mg g}^{-1}\text{RW}$ ; <sup>2</sup>:  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{RW}$ ; <sup>3</sup>:  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{TSP}$ ; <sup>4</sup>:  $\text{mg g}^{-1}\text{TSP}$ .

Les valeurs indiquées proviennent d'une mesure en triple sur le même extrait. / The values indicated were calculated from a triple measurement on the same extract.

Donkin, 1987 ; Neumann *et al.*, 1989). Au cours de nos expérimentations, le matériel végétal est prélevé en fin de phase d'enracinement (8 à 10 semaines après repiquage). Nous avons pu montrer (de Touchet *et al.*, 1993) que les ressources en hydrates de carbone du milieu étaient épuisées à cette date. Ce résultat peut expliquer, en partie, les teneurs et activités spécifiques RubisCO relativement élevées que nous avons pu mesurer dans le matériel en fin de phase *in vitro*.

Les valeurs des teneurs en RubisCO estimées par immunoélectrophorèse chez le

palmier à huile et le cocotier (de l'ordre de 25 % des protéines solubles) sont comparables à celles obtenues chez d'autres espèces en  $\text{C}_3$ . Collatz *et al.* (1979) ont mesuré des concentrations en RubisCO de 38 à 55 % chez diverses plantes en  $\text{C}_3$ . Les valeurs légèrement plus faibles mesurées sur les arbres adultes peuvent s'expliquer du fait que notre matériel n'est pas cultivé dans son milieu naturel, mais en serres tropicales, la lumière jouant probablement un rôle de facteur limitant. Une campagne de mesures sur le terrain devrait permettre de connaître les valeurs réelles d'activité et de

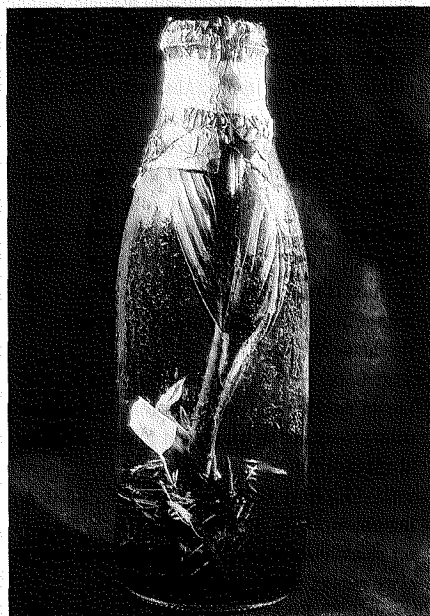
teneur dans les feuilles matures de palmier et de cocotier.

En outre, Collatz *et al.* (1979), puis Catt et Millard (1988) ont rapporté des taux en RubisCO du même ordre, dans les feuilles de différentes espèces, en faisant appel à d'autres techniques immunoenzymatiques, telles que des tests RIA ou ELISA. Face à ces techniques lourdes et coûteuses, l'immunoélectrophorèse présente les avantages de son faible coût de revient (en équipement comme en fonctionnement), de sa relative facilité de mise en œuvre et de sa transférabilité.

## Conclusion

Ce travail présente les premiers résultats obtenus sur les caractéristiques immunologiques de la RubisCO foliaire de 2 palmacées oléagineuses tropicales : le palmier à huile et le cocotier. Des réactions sérologiques positives ont pu être observées entre les extraits foliaires des 2 espèces étudiées et les antisera de lapin dirigés contre la RubisCO de 2 plantes en  $\text{C}_3$  (tabac et épinard) et d'une plante en  $\text{C}_4$  (maïs). Indépendamment de l'antisérum considéré, une homologie sérologique complète a été observée entre les RubisCO de palmier à huile et de cocotier.

D'un point de vue appliqué, l'immunoélectrophorèse apparaît comme une technique parfaitement appropriée pour la quantification de la RubisCO dans notre matériel végétal. Elle a été appliquée, en routine, lors d'études menées par notre équipe



**Photo 2.** Vitroplant de cocotier. / Coconut in vitro plantlet.



**Photo 3.** Station de sevrage en plantation. Acclimatization unit at a plantation.



sur la photosynthèse *in vitro* et l'acclimatation du palmier à huile (Rival *et al.*, 1994a, 1994b, 1996).

L'évaluation immunologique de la quantité de RubisCO (couplée à la mesure de l'activité spécifique de l'enzyme par incorporation de  $^{14}\text{CO}_2$ ) peut fournir des données complémentaires de celles obtenues par d'autres voies d'investigation de l'activité photosynthétique (mesure des échanges gazeux, évaluation *in situ* de la fluorescence des chlorophylles). L'estimation de la photosynthèse par mesure des échanges gazeux *in planta* reste cependant la méthode la plus proche de la réalité. Ces mesures restent cependant relativement lourdes et délicates à mettre en œuvre dans le cas des vitroplants, qui doivent être analysés dans leur environnement spécifique (Rival *et al.*, 1996).

Au cours de programmes de recherche destinés à évaluer le rendement ou la résistance aux stress (sécheresse, pathogènes), cette approche peut permettre de décrire plus précisément le taux d'enzyme présent et la capacité potentielle de la RubisCO exprimée dans le matériel végétal considéré. Toutefois, ces mesures ne rendent pas compte des nombreuses régulations auxquelles est soumise l'activité enzymatique, qui ont été souvent rapportées (Ogren *et al.*, 1986 ; Suzuki, 1987).

Les recherches actuellement en cours dans notre groupe s'intéressent au suivi simultané du taux en RubisCO et des activités spécifiques RubisCO et PEPC au cours du développement *in vitro* d'embryons zygotiques (Assy Bah, 1986) et somatiques (Verdeil *et al.*, 1992) de cocotier, en comparaison avec des plantules issues du semis de noix.

### Remerciements

Cet article est dédié à la mémoire de notre collègue Béatrice Assy Bah, qui nous a quittés bien trop tôt en août dernier.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un programme de recherche conduit conjointement par l'ORSTOM (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération) et le CIRAD-CP (département des cultures pérennes du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement).

Les auteurs remercient Frédérique Richaud pour l'excellente qualité de son assistance technique.

### Bibliographie / References

- AFIF D., GÉRANT D., CAVAILLÉ G., DIZENGREMEL P., 1993. Physical, immunological and kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from fir (*Abies alba*) and spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.* 88 : 113-122.
- ANDREWS T.J., LORIMER, G.H. 1987. RubisCO: structure, mechanisms and prospects for improvement. In : The biochemistry of plants: a comprehensive treatise, M.D. Hatch, N.K. Bordman éd., New York, Etats-Unis, Academic Press, 10, p.131-218.
- ASSY BAH B., 1986. *In vitro* culture of coconut zygotic embryos. *Oléagineux* 41 (7) : 321-328.
- BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- CAPPELLADES M., LEMEURE R., DEBERGH P., 1990. Kinetics of chlorophyll fluorescence in micro-propagated rose shootlets. *Photosynthetica* 24 (1) : 190-193.
- CATT J.W., MILLARD P., 1988. The measurement of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase concentration in the leaves of potato plants by ELISA. *J. Exp. Bot.* 39 (199) : 157-164.
- COLLATZ G.J., BADGER M., SMITH C., BERRY J.A., 1979. A radioimmuno assay for RuP2 carboxylase protein. In: Carnegie institution year book 78, Stanford, Etats-Unis, Carnegie institution of Washington, p.171-175.
- GROUT B.W.W., DONKIN M.E., 1987. Photosynthetic activity of cauliflower meristems cultures *in vitro* and at transplanting into soil. *Acta Hort.* 212 : 323-327.
- HOUDIER C., DESJARDINS Y., 1994. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenol pyruvate carboxylase activity in *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36 : 27-33.
- KUMAR P.P., BENDER L., THORPE T.A., 1988. Activities of ribulose biphosphate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase and  $^{14}\text{C}$ -bicarbonate fixation during *in vitro* culture of *Pinus radiata* cotyledons. *Plant Physiol.* 87 : 675-679.
- LAURELL C.B., 1966. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 15 : 45-52.
- LAVERGNE D., NATO A., DUPUIS J.M., PÉAN M., CHAGVARDIEFF P., 1992. Evidence for the expression of morphological and biochemical characteristics of C3-photosynthesis in chlorophyllous callus cultures of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 84 : 292-300.
- MIZIORKO H.M., LORIMER G.H., 1983. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 52 : 507-535.
- NATO A., MATHIEU Y., BRANGEON J., 1981. Heterotrophic tobacco cell cultures during greening. II. Physiological and biochemical aspects. *Physiol. Plant.* 53 : 335-341.
- NATO A., HOARAU J., BRANGEON J., HIREL B., SUZUKI A., 1985. Regulation of carbon and nitrogen assimilation pathways in tobacco cell suspension cultures in relation with ultrastructural and biochemical development of the photosynthetic apparatus. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures, K.H. Neumann, W. Barz et E. Reinhard éd., Berlin, Allemagne, Springer-Verlag, p. 43-57.
- NEUMAN K.H., GROSS U., BENDER L., 1989. Regulation of photosynthesis in *Daucus carota* and *Arachis hypogaea* cell cultures by exogenous sucrose. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures, W.G.W. Kruz éd., Berlin, Allemagne, Springer Verlag, p. 281-291.
- OGREN W.L., SALVUCI M.E., PORTIS JR A.R., 1986. The regulation of RubisCO activity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B*, 313 : 337-346.
- OUCHTERLONY H., 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy.* 5 : 1-78.
- RIVAL A., DUVAL Y., VERDEIL J.L., ABERLENC F., 1994a. Recent advances in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal propagation. In: Applications of plant in vitro technology symposium, UPM, Kuala Lumpur, Malaisie, 16-18 novembre 1993, p. 156-164.
- RIVAL A., NATO A., LAVERGNE D., DUVAL Y., 1994b. Carboxylases (PEPC and RubisCO) activities during in vitro development and acclimatization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: VIIIth International congress of plant tissue and cell culture, IAPTC, Firenze, Abstract n°S20-13, p. 261.
- RIVAL A., BEULÉ T., LAVERGNE D., NATO A., HAVAUX M., PUARD M., 1996. Development of photosynthetic characteristics in oil palm during in vitro micropropagation. *J. Plant Physiol.* (sous presse).
- SUZUKI A., 1987. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. I. Structural, immunochemical and catalytic properties. *Biochimie* 69 : 723-734.
- TOUCHET B. DE, NATO A., LAVERGNE D., DUVAL Y., 1993. Liquid medium and carboxylase activities in oil palm propagated in vitro. *Plant Physiol. Biochem.* 31 (6) : 931-935.
- VERDEIL J.L., HUET C., GROSDÉMANGES F., RIVAL A., BUFFARD-MOREL J., 1992. Coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis: obtention of several clone ramets. *Oléagineux* 47 (7) : 465-469.
- WILLIAMS L.E., KENNEDY R.A., 1978. Photosynthetic carbon metabolism during leaf ontogeny in *Zea mays* L. : enzymes studies. *Planta* 142 : 269-274.

# Immunological study of RubisCO in oil palm and coconut

Rival A.<sup>1</sup>, Beulé T.<sup>1</sup>, Nato A.<sup>2</sup>, Laverne D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CIRAD-CP/ORSTOM, LRGAPT, BP 5045, 911 avenue Agropolis, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> Université de PARIS XI, Centre d'Orsay, LMVE, bat. 430, 91405 Orsay, France

**R**ibulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO; EC 4.1.1.39) is involved in the first stage of the pentose phosphate cycle (Calvin cycle): carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) fixation onto Ribulose diphosphate molecules (figure 1). As a result, the enzyme plays a determining role in photosynthesis regulation. RubisCO is found in very large quantities, and accounts for some 25% of total leaf proteins in C<sub>4</sub> plants and up to 50% of leaf proteins in C<sub>3</sub> plants (box 1). The 40 million tonnes of RubisCO on the earth's surface are assumed to fix some 10<sup>11</sup> tonnes of CO<sub>2</sub> per year! (Miziorko and Lorimer, 1983). The key role of RubisCO in the photosynthesis process as a whole has prompted numerous fundamental studies on a wide range of species (Miziorko and Lorimer, 1983; Suzuki, 1987).

In higher plants, RubisCO has been found in the stroma of the chloroplasts of chlorenchymatous cells in C<sub>3</sub> plants and CAM (Crassulacean acid metabolism) plants, and in the chloroplasts of the cells in the sheath of the crown structure (Kranz cells) in C<sub>4</sub> plants.

In higher plants such as algae, cyanobacteria and photosynthetic bacteria, RubisCO is an oligomeric complex of eight large (LSU: 50-55 kiloDalton (kDa)) and eight small (SSU: 12-18 kDa) sub-units, arranged symmetrically (figure 2).

When C<sub>3</sub> plants are cultured *in vitro* on a carbohydrate-rich medium (generally glucose or sucrose), the inorganic carbon (CO<sub>2</sub>) is

assimilated via two carboxylation pathways. One occurs in the chloroplast and is controlled by RubisCO, i.e. the conventional pathway that occurs in leaves *in planta*, whilst the other is controlled in the cytosol by phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) (Nato *et al.*, 1981; Kumar *et al.*, 1988; Hdider and Desjardin, 1994).

The ratio of PEPC to RubisCO activity is a precise indicator of the relative importance of non-photosynthetic (heterotrophic) and photosynthetic (autotrophic) CO<sub>2</sub> fixation in plant material (Kumar *et al.*, 1988). In C<sub>3</sub> plants such as oil palm and coconut, the PEPC: RubisCO ratio is around 0.1 in the leaves of adult palms under natural conditions (Williams and Kennedy, 1978).

Changes in the ratio of PEPC: RubisCO activity in oil palm were studied during the different stages of *in vitro* micropropagation by somatic embryogenesis, and during ramet acclimatization to natural conditions (de Touchet *et al.*, 1993; Rival *et al.*, 1994a, 1994b, 1996). Our group is currently studying the changes in the PEPC: RubisCO ratio *in vitro* on coconut, where plant acclimatization problems on leaving the culture tubes are more acute (Triques and Rival, pers. comm.). Studying RubisCO is particularly worthwhile for material cultured *in vitro*, since the activity of this enzyme also provides information on the integrity of the chloroplast structure.

Measurements of carboxylase activity and carboxylase quantification, combined with other photosynthesis parameters such as gas exchange or photochemical activity (estimated by *in situ* chlorophyll fluorescence) provide a better understanding of the mechanisms involved in the autotrophy of material cultured *in vitro* and in acclimatization to natural conditions.

This article sets out to propose a simple and reliable immunoenzymatic method for quantifying the RubisCO enzyme in oil palm and coconut.

Initially, anti-RubisCO antisera of various origins were tested against crude enzyme extracts from oil palm and coconut leaves, using the Ouchterlony double immunodiffusion test (1958).

RubisCO contents could then be tested by Laurell immunoelectrophoresis (1966), given

the positive serological reactions obtained with the antisera tested.

## Material and methods

### Plant material

#### Oil palm

The leaves used for our study were taken from the spear of a two-year-old adult oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) grown from seed in a tropical greenhouse. The selected germinated hybrid seeds of *dura* x *pisifera* origin (D1439) were kindly supplied by Dr N. Djegui, Director of INRAB-SRPH<sup>(1)</sup> in Pobé, Benin.

The clonal ramets (clone TRL 80, *dura* x *pisifera* origin) were obtained by *in vitro* micropropagation of leaf explants by somatic embryogenesis (Pannetier *et al.*, 1981). The leaves were sampled at the end of the *in vitro* rooting stage (photo 1).

#### Coconut

Leaves were taken from the spear of an adult PB 121 (Malayan Yellow Dwarf x West African Tall) hybrid coconut palm (*Cocos nucifera* L.) grown in a tropical greenhouse from plantlets produced by *in vitro* embryo culture. The zygotic embryos isolated to produce the palm were sampled and cultured by Dr B. Assy Bah at the IDEFOR/DPO<sup>(2)</sup> Marc Delorme research station, Côte d'Ivoire. The plantlets used for RubisCO immunoquantification were obtained

## Abbreviations

DTT, dithiothreitol; EDTA, Ethylene diamino tetraacetic acid; ELISA, Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay; OAA, oxaloacetic acid; 3PGA, 3-phosphoglyceric acid; PMSF, phenyl-methyl sulfonyl fluoride; TSP, total soluble proteins; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31); PVP, polyvinyl pyrrolidone; RIA, Radio Immuno Assay; RubP, Ribulose-1,5 diphosphate; RubisCO, Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39).

<sup>(1)</sup> Institut national de la recherche agronomique du Benin. Station de recherches sur le palmier à huile.

<sup>(2)</sup> Institut des forêts. Département des plantes oléagineuses.

## C<sub>3</sub> plants, C<sub>4</sub> plants

In C<sub>3</sub> plants (tobacco, spinach, oil palm, coconut), atmospheric CO<sub>2</sub> is incorporated in the Calvin cycle. The first stage of photosynthesis is CO<sub>2</sub> fixation onto RubP molecules, catalysed by RubisCO.

In C<sub>4</sub> plants (maize, sugarcane), primitive CO<sub>2</sub> fixation occurs in the cells of the perivascular sheath (Kranz cells), via the Hatch and Slack cycle. The CO<sub>2</sub> is fixed onto the PEP by PEPC, resulting in an oxaloacetate molecule (unstable).

When cells or organs of C<sub>3</sub> plants are cultured *in vitro* on a carbohydrate-rich medium, the metabolism moves towards C<sub>4</sub> type CO<sub>2</sub> fixation via the PEPC pathway. The PEP is supplied by glycolysis, and CO<sub>2</sub> fixation is non-photosynthetic (anaplerotic).



by culturing mature PB 121 zygotic embryos (Assy Bah, 1986). Leaf samples were taken from the plantlets at the end of the *in vitro* rhizogenesis phase (photo 2).

### Soluble protein and RubisCO extraction

Fresh leaves (approx. 1 g FW<sup>(3)</sup>) were ground using a pestle and mortar in 10 ml of extraction buffer containing: Tris (100 mM), pH 7.6, 2.5 mM EDTA, 5 mM DTT, 33% insoluble PVP (gg<sup>-1</sup> FW of leaves), 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 250  $\mu$ M PMSF. The homogenate was centrifuged (40 000 g, 30 min). The soluble proteins in the supernatant were kept as the crude enzyme extract (CEE). All operations were carried out at 0-4°C. The enzyme extracts were used for the immunoenzymatic tests without further preparation.

### Protein quantification

The proteins in the extract were quantified by colorimetry, using Bradford's method (1976), with Bovine Serum Albumin (Sigma P-0914) as a standard.

### Measuring enzyme activity

RubisCO activity was measured *in vitro* on the crude enzyme extracts by RubP-dependent incorporation of <sup>14</sup>C labelled sodium bicarbonate, using the method described by Nato *et al.* (1985). The crude extracts were incubated at 30°C for 30 minutes. Specific RubisCO activity was expressed in  $\mu$ mol CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of proteins.

### Immunological tests

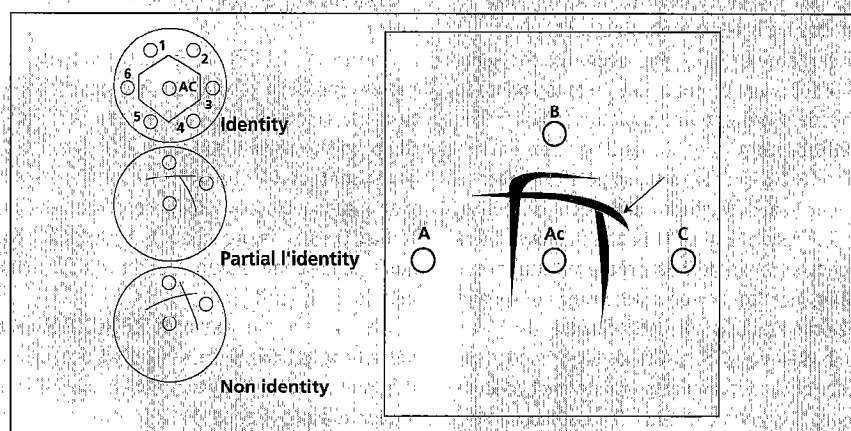
Double immunodiffusion tests were carried out using the Ouchterlony method (1958). The agarose gels were prepared with 166 mM Borate/NaOH buffer, pH 8.0, NaCl 1.3 M, glycerol (5% v/v). Pre-immune serum was used as a control. Ten microlitres of antiserum or protein solution were placed in equidistant wells bored with a cork borer. Our study tested three rabbit antisera raised against RubisCO extracted from tobacco (Nato *et al.*, 1985), spinach (gift from Dr. Piquemal, CNRS Toulouse, France) and maize leaves (Lavergne *et al.*, 1992). These antisera were subsequently called RT, RS and RM respectively. The immunoprecipitated protein bands were allowed to develop for 24 h at 4°C in a humid chamber. The gels were then rinsed with 0.9% NaCl to remove surplus proteins, and dried in an oven set at 40°C. The precipitated protein bands were stained with Coomassie brilliant blue R250 in acetic acid/methanol/water (1.5:45:53.5), then destained in acetic acid/methanol/water (10:45:45).

<sup>(3)</sup> FW: fresh weight.

### Laurell immunoelectrophoresis

**Principle:** antigens (plant enzyme extracts) and antibodies (rabbit antisera) are allowed to diffuse freely from wells bored in a low-concentration agarose gel deposited on a glass slide. At equal concentrations, they produce an immunoprecipitated protein band. Thus, if there is a relative excess of antibodies compared to antigens, the bands form nearer to the well containing the antigen, and vice versa.

**Cross-reaction analysis:** antiserum Ac is placed in the central well and raised against antigen B, which precipitates it, giving two precipitin bands. It is also precipitated by antigens A and C. Antigen A has the same determinant as antigen B, and the precipitin produced by A directly prolongs the two precipitins produced by B. The reaction is totally homologous. Antigen B may be contaminated by A, which would explain why A has only one of the two determinants shown by B. Moreover, the antiserum may not be monospecific and recognise the two antigens. Antigen C has a determinant similar to B (partial identity reaction). The projection shown by the arrow is on the opposite side to the well containing antigen B against which the antiserum was raised.



### Immuno-electrophoresis

RubisCO contents in the crude enzyme extracts were estimated by immuno-electrophoresis using the Laurell method (1966), with a 50 mM Tris-Glycine gel/well buffer system (pH 8.3). The gels were prepared with 1.5% low-gelling type agarose (Sigma A6013). We used 36 ml of agarose/buffer solution to prepare a gel measuring 170 mm x 80 mm, containing 60  $\mu$ l of RS antiserum. Commercially available purified spinach RubisCO (Sigma R-8000) was used as a calibration standard. Horizontal electrophoresis was carried out at 80 V (15 mA) for 12 h at 4°C. After electrophoretic migration, the gels were rinsed with 0.9% NaCl, then dried and stained as described above for the Ouchterlony tests.

The area of immunorockets was calculated after gel scanning using an image processing system (Leica Quantimet 500). Relative RubisCO contents in the crude extracts were estimated after producing a regression curve using purified spinach RubisCO.

### Results and discussion

#### Immunological identity of the RubisCO extracted from oil palm and coconut

Figure 3 shows the results of the double immunodiffusion tests performed with the RT

(tobacco) antiserum. There was total serological cross-reaction between the RubisCO proteins extracted from oil palm (OP), spinach (SP) and coconut (CO). Likewise, when the test was performed with the RM (maize) anti-RubisCO antiserum (figure 4), there was total cross-reaction between the three extracts, as shown by the contiguous immunoprecipitation bands.

The spinach (RS) anti-RubisCO antiserum (figure 5) also revealed total cross-reaction

### Laurell immunoelectrophoresis

A monospecific antiserum was fixed in an agar slab. Different concentrations of the antigen preparation to be quantified were deposited in a row of wells. An electric current was then applied perpendicularly to the row of wells. An immunorocket formed and spread whilst there was an excess of antigen. The existence of a linear relation between antigen concentration in the well and immunorocket area meant that the method could be used for accurate, sensitive antigen quantification. A series of preliminary tests was essential to determine the optimum antibody concentration in the gel. If the concentration was too low, very high peaks were obtained, with no linear relation to the amount of antigen deposited.



between the oil palm and coconut extracts, whereas the cross-reaction was only partial between oil palm and spinach and between coconut and spinach.

Further double immunodiffusion tests were performed with a view to comparing the immunoreactivity of the three antisera with respect to a given enzyme extract. Figures 6 and 7 confirm that there is a positive cross-reaction between the extracts of both palms and all the antisera tested. The lack of an immunoprecipitation band with a pre-immune serum was confirmed. The specificity of the three antisera (RT, RS and RM) was checked using purified spinach RubisCO (figure 8). A single precipitin band was produced, demonstrating the RubisCO monospecificity of the antisera used.

The total serological cross-reaction between the RubisCO extracted from oil palm and coconut, two palms from the *Arecaceae* family confirmed the results reported by Suzuki (1987). In fact, according to this author, as far as the primary structure is concerned (amino acid sequence), the degree of cross-reaction is 95% for the large sub-unit (LSU) and 70% for the small sub-unit (SSU) in higher plants, which would explain the partial identity reactions obtained in double immunodiffusion tests on tobacco/spinach, spinach/maize, and also spinach/*Chlorella* and spinach/*Clostridium*, using an antiserum raised against the holoenzyme extracted from the first species in the test pair (Suzuki, 1987).

Similarly, Afif *et al.* (1993) observed excellent conservation of LSU characteristics between two conifer species.

The results obtained with oil palm and coconut by raising three different antisera against the holoenzyme therefore suggested total serological cross-reaction, probably for both sub-units, whilst oil palm and coconut RubisCO on the one hand and spinach RubisCO on the other probably only shared the large sub-unit. A western blot study with the three antisera tested will undoubtedly confirm this.

We have already revealed serological cross-reactions between a tobacco anti-RubisCO antiserum and oil palm leaf extracts (de Touchet *et al.*, 1993). The detection of total serological cross-reaction between the RubisCO extracted from oil palm and coconut should now open the way for immunoquantification of the enzyme in coconut and its application in characterizing planting material produced by *in vitro* culture.

## RubisCO immunoquantification

### Calibration

The reference curve was plotted using commercially available purified spinach

RubisCO (Sigma R-8000), within a range of 30 to 550 ng (figure 10). The amount of RubisCO was significantly correlated ( $r = 0.998$ ) to immunorocket area. The sensitivity of the method was therefore highly satisfactory, since it detected and correctly estimated RubisCO quantities below 50 ng in 3 to 10  $\mu$ l of enzyme extract, (around 10 mg fresh weight). Moreover, it is worth noting that RubisCO can be quantified in crude enzyme extracts, with no prior purification.

### Comparative estimate of RubisCO activity and contents

We compared leaf RubisCO contents in adult palms with those in *in vitro* plantlets sampled just before *ex vitro* acclimatization for both species. Figure 9 gives the results of immunoelectrophoresis on crude extracts, at constant protein levels (around 2  $\mu$ g per extract). The table shows the results for RubisCO contents (in mg g<sup>-1</sup> of proteins) and total and specific RubisCO activity (expressed in relation to the fresh weight or amount of soluble proteins).

Immunoelectrophoresis was used to estimate RubisCO contents in oil palm ramets and adults at  $25 \pm 2\%$  and  $35 \pm 10\%$  of soluble proteins respectively. The figures for coconut were  $25 \pm 8\%$  in *in vitro* plantlets and  $21 \pm 5\%$  in adult palms.

RubisCO levels were therefore similar in the two species, but it is worth noting that in the case of oil palm alone, RubisCO activity and contents were greater in adult palms. The occurrence of comparable RubisCO contents in adult coconut palms and *in vitro* plantlets confirmed the efficacy of the improved embryo culture protocol developed by our group, which involves culturing the *in vitro* plantlets in large capacity culture containers (1 l) on 200 ml of liquid medium for a further two months as compared with the procedure described previously (Assy Bah, 1986). This produces plantlets 15 to 20 cm long, with a well developed root system and four or five open leaves (photo 2). *In vitro* plantlets cultured in this way had RubisCO contents comparable to those of adult palms grown in greenhouses, which bodes well for autotrophic growth after weaning. As a result, the success rate for *ex vitro* acclimatization of this material is over 90% (photo 3).

Sucrose, which is used as a carbon source in culture media, is generally assumed to be responsible for RubisCO inhibition (Grout and Donkin, 1987; Neumann *et al.*, 1989). During our experiments, plant material was sampled at the end of the rooting phase (eight to ten weeks after transfer). We demonstrated (de Touchet *et al.*, 1993) that the carbohydrates in the medium had been exhausted by that stage,

and this may partly explain the relatively high RubisCO contents and specific activity measured in the material at the end of the *in vitro* stage.

The RubisCO contents estimated by immunoelectrophoresis in oil palm and coconut (around 25% of soluble proteins) are comparable to those for other C<sub>3</sub> species. Collatz *et al.* (1979) measured RubisCO concentrations of between 38 and 55% in various C<sub>3</sub> plants. The slightly lower values measured in adult palms were probably due to the fact that our palms were not grown under natural conditions, but in tropical greenhouses, and light was probably a limiting factor. A series of field measurements should provide the true figures for RubisCO activity and contents in mature oil palm and coconut palm leaves.

Moreover, Collatz *et al.* (1979), and Catt and Millard (1988) reported similar RubisCO contents in the leaves of different species using other immunoenzymatic techniques such as RIA or ELISA tests. In comparison with these costly, complex techniques, immunoelectrophoresis offers the advantage of being cheap (in terms of both equipment and operation), relatively easy to use and transferable.

### Conclusion

This work produced the first results on the immunological characteristics of RubisCO found in the leaves of two tropical palms: oil palm and coconut. Positive serological reactions were observed between leaf extracts from the two species studied and the rabbit antisera raised against the RubisCO of two C<sub>3</sub> plants (tobacco and spinach) and a C<sub>4</sub> plant (maize). Independently of the antiserum studied, total serological cross-reaction was observed between the oil palm and coconut RubisCO proteins.

In terms of possible applications, immunoelectrophoresis seems ideally suited to RubisCO quantification in plant material. It was routinely used in our laboratory for studies of *in vitro* photosynthesis and acclimatization in oil palm (Rival *et al.*, 1994a, 1994b, 1996).

Immunological evaluation of the amount of RubisCO (combined with measurement of the specific activity of the enzyme via <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> incorporation) can provide further data in addition to those obtained by other methods for investigating photosynthetic activity (gas exchange measurements and *in situ* evaluation of chlorophyll fluorescence). Estimating photosynthesis by measuring gas exchanges *in planta* is still the most reliable method, but such measurements are complex and technically difficult in the case of *in vitro* plantlets, which have to be analysed in their specific environment (Rival *et al.*, 1996).



This approach can be used in research programmes aimed at evaluating yields or resistance to stress (drought, pathogens) to more accurately quantify enzyme amounts and potential RubisCO capacities in the plant material considered. However, measurements of this type do not take into account the many ways in which enzyme activity may be regulated (Ogren *et al.*, 1986; Suzuki, 1987).

The research currently being carried out by our group concerns simultaneous monitoring of RubisCO contents and specific RubisCO and PEPC activity during the *in vitro* development of coconut zygotic embryos (Assy-Bah, 1986) and somatic embryos (Verdeil *et al.*, 1992), as compared with plants grown from seednuts. ■

#### Acknowledgements

This paper is dedicated to the memory of our colleague Dr. Beatrice Assy Bah who died last August.

This work was conducted under a joint research programme between ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération) and CIRAD-CP (Tree Crops Department of the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement).

The authors would like to thank Frédérique Richaud for the excellent technical assistance she provided.

**Erratum :** veuillez remplacer le tableau 2, page 348 de PRD 3 (5), par le tableau ci-dessous. / *Please replace table 2, page 348 from PRD 3 (5) with the table below.*

**Tableau 2. Croissance, production, profil physiologique et encoche sèche en fonction de la fréquence de saignée et de la stimulation hormonale chez le clone d'hévéa PB 217. / Influence of tapping frequency and hormonal stimulation on growth, production, physiological profile and tapping panel dryness in the PB 217 Hevea clone.**

Fréquence de saignées <i>Tapping frequency</i>	Circonférence (cm) <i>Girth (cm)</i>	Production			Paramètres physiologiques/ <i>Physiological parameters</i>						Encoche sèche (%) <i>Tapping panel dryness (%)</i>	
					ES (%) <i>TSC (%)</i>		SAC (mM) <i>Suc (mM)</i>		Pi (mM)	R-SH (%)	LEM <i>DCL</i>	Arb. secs <i>Dry trees (T)</i>
		g/a/s <i>g/T/t</i>	cumulée g/a/ <i>cumulated g/T</i>	kg/a/an <i>kg/T/yr</i>	Expérience <i>Trial</i>							
					début <i>start</i>	fin <i>end</i>	début <i>start</i>	fin <i>end</i>	fin <i>end</i>	fin <i>end</i>	fin <i>end</i>	fin <i>end</i>
1/2S d/2 6d/7 0/Y (3 fois/semaine) (3 times/week) 0 stimulation	76,4	28,4 ) (100 %)	31 026 (100 %)	5,1	28,6	43,2	27,0	18,9	23,6	1,01	3,3	0
1/2S d/3 6d/7 4/Y (2 fois/semaine) (twice/week) 4 stimulations	72,9	43,4 (153 %)	33 581 (108 %)	4,2	32,3	42,8	24,9	16,1	25,3	0,96	6,2	0
1/2S d/3 6d/7 8/Y (2 fois/semaine) (twice/week) (8 stimulations)	73,2	53,7 (189 %)	39 113 (126 %)	5,6	29,2	40,7	28,1	19,7	26,2	0,99	0,3	0
1/2S d/3 6d/7 12/Y (2 fois/semaine) (twice/week) 12 stimulations	73,4	55,4 (195 %)	40 323 (130 %)	5,8	29,6	43,6	25,0	14,2	27,9	0,93	6,3	0
1/2S d/6 6d/7 8/Y (1 fois/semaine) (once/week) 8 stimulations	74,7	72,8 (256 %)	26 488 (85 %)	3,8	32,5	48,1	18,7	14,7	23,1	0,88	0,3	0
1/2S d/6 6d/7 12/Y (1 fois/semaine) (once/week) 12 stimulations	75,1	80,8 (284 %)	29 377 (95 %)	4,2	35,1	48,9	18,3	12,5	30,9	1,05	3,7	0

Y: Nombre de stimulations annuelles. / Annual number of stimulations.